

文章编号: 1001-1498(2007)05-0699-06

银腺杨转 *Cry IAc*和 *API*双价抗虫基因的研究*

李科友¹, 樊军锋^{1**}, 赵忠¹, 李玲², 朱海兰¹

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:在建立以银腺杨(84K)叶片为外植体的再生系统基础上,通过农杆菌介导法把 *Cry IAc*和 *API*双价抗虫基因导入银腺杨(84K)基因组中。转化杨树叶片,在含有卡那霉素的培养基上诱导不定芽和诱导生根,获得了400株卡那霉素抗性转化再生植株。抗性植株经PCR检测,有70株呈阳性。通过Southern杂交和ELISA检测进一步证明 *Cry IAc*和 *API*双价抗虫基因已整合到银腺杨(84K)基因组中,拷贝数1~2个,并得到了表达。转化植株用杨扇舟蛾幼虫进行饲虫试验,结果表明昆虫幼虫的死亡率高达60.0%~80.0%。同时,存活幼虫的生长发育也受到了明显抑制。本研究结果为杨树抗虫育种提供了新的种质资源。

关键词:银腺杨(84K); *Cry IAc*和 *API*基因; 转化; 抗虫性

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Transformation of *Cry IAc* and *API* Two Insect-resistant Genes to Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

LI Ke-you¹, FAN Jun-feng¹, ZHAO Zhong¹, LI Ling², ZHU Hai-lan¹

(1. College of Forestry, Northwest Sci-Tech of Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Based on the established leaf explant regeneration system of poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa* cv. 84K), *Cry IAc* and *API* fused genes were introduced into the genome of poplar 84K by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Through successive selection in the period of shoot and root induction under high level kanamycin-pressure, 400 kanamycin-resistant regenerated plants were obtained, 70 of them were positive resulted by PCR detection. Southern hybridization and ELISA detection were further showed that *Cry IAc* and *API* gene had been integrated into the genome of 84K with one or two copies and expressed. The transformation plants were given insect feeding test with larvae of *Closteria anachoreta*. The results showed the mortality of insect larvae was accounted for 60.0% ~ 80.0%, and the growth of the survival larvae were seriously inhibited. These plants could provide new resources for poplar insect-resistant breeding.

Key words: poplar (*P. alba* × *P. glandulosa* cv. 84K); *Cry IAc* and *API* gene; transformation; resistance to insect

银腺杨 (*Populus alba* L. × *P. glandulosa* Dode cv. 84K)是20年来我国推广范围最广,数量最多,产业化最好的两个杨树品种之一。但由于害虫严

重,每年都给杨树人工林造成巨大的损失。利用基因工程技术培育抗虫杨树,是防治害虫的有效手段^[1~3]。目前在杨树上应用的抗虫基因主要有两

收稿日期: 2007-03-16

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项“耐盐抗虫转基因杨树新品种选育(JY03-B-26-02)”。

作者简介: 李科友(1962—),男,陕西武功人,副教授,主要从事生物技术和植物化学研究。

* 本研究工作在国家林业局林木育种与生物技术重点实验室完成。

** 通讯作者: 樊军锋(1962—),男,陕西扶风人,副教授,主要从事林木遗传育种研究。

类:一是从微生物苏云金杆菌中分离出的苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因,简称 Bt 毒蛋白基因;二是从植物中分离出的昆虫蛋白酶抑制剂基因。Bt 毒蛋白基因已在欧洲黑杨 (*P. nigra* L.)^[4-6]、杂交杨 [(银白杨 × 大齿杨 NC5339 *P. alba* × *P. grandidentata* Michx. cl. NC5339, 美洲黑杨 × 小叶杨 NL80106 *P. deltoides* Barttr. × *P. simonii* Carr. cl. NL80106, 银白杨 × 大齿杨 *P. alba* × *P. grandidentata*)^[7-9]、741 杨 [(*P. alba* L. × *P. davidiana* Dode + *P. simonii* Carr.) × *P. tomentosa* Carr.]^[10]、美洲黑杨^[11]、欧美杨 [*P. × euramericana* (Dode) Guineir]^[12]等杨树抗虫育种中得到应用,并获得了良好的效果。导入杨树的蛋白酶抑制剂有马铃薯胰蛋白酶抑制剂 (Pint)^[13-15]、水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (OCI)^[16]、拟南芥半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Accys)^[17]和豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CPTI)^[18]等。但 Bt 毒蛋白杀虫谱带较窄,且易诱导昆虫对其产生耐受性。与 Bt 毒蛋白相比,蛋白酶抑制剂具有抗虫谱广,对人畜无副作用及昆虫不易产生耐受性等特点,但存在着在转基因植株中表达量低等弱点。迄今为止,大多数的研究工作都是将单一的抗虫基因转入植物,容易使害虫产生耐受性。解决这一问题比较有效的方法就是同时使用两种或两种以上不同抗虫机制的抗虫基因转化植物,即使害虫对其中一种毒素产生抗性,转基因植物的抗虫能力也不至于丧失^[19-22]。

银腺杨 (84K) 是韩国杨树育种专家培育成功的一个著名白杨派 (Sect *Leuce* Duby) 内种间杂种。1984 年引入我国,1987 年通过中国林业科学研究院引入陕西。其抗逆性强 (能耐 -30 低温), 材质好, 生长快 (1 年生苗最高达 5 m), 树干通直, 树皮光滑, 树形优美, 雄性不飞絮, 根系十分发达, 根蘖能力强, 固土效果好。银腺杨 (84K) 不仅是一个优良的工业用材树种, 一个优美的城乡绿化树种, 也是一个良好的防护林树种。为提高该品种抗虫性, 笔者采用叶盘法开展了银腺杨 (84K) 双价 Bt (*Cry IAc*) 和 API 基因转化研究, 以培育银腺杨 (84K) 抗虫转基因新品种。

1 材料和方法

1.1 抗虫基因、植物表达载体及农杆菌菌株

1.1.1 抗虫基因 本实验所转基因为中国科学院微生物研究所构建的 Bt (*Cry IAc*) (部分改造) 和 API (慈菇蛋白酶抑制剂基因) 双抗虫基因。

1.1.2 植物双价二元表达载体 如图 1 所示, 在此表达载体中, 两个抗虫基因分别处于两个达框架中, 所用的启动子都是具有双增强子的 CaMV 35S 启动子, 在启动子下游和翻译起始位点上游都存在一个 TMV -RNA 的翻译增强子“ ”片段, 这种带“ ”的结构将有利于外源基因在植物中的高效表达^[23]。

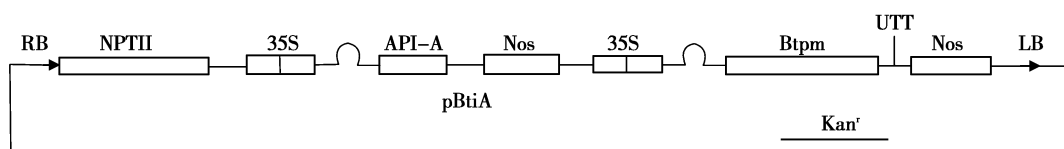


图 1 含有双抗基因的植物表达载体的构建

1.1.3 农杆菌菌株 农杆菌菌株选用 LBA4404, 将 pBtiA 双价二元表达载体采用电击法转入 LBA4404。

1.2 转化受体系统的建立

1.2.1 卡那霉素 (Km) 敏感性试验

1.2.1.1 叶片 Km 敏感性试验 将叶片外植体沿主脉横切后放入含有 0、20、30、40、50、60 mg · L⁻¹ Km 的不定芽诱导培养基 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ NAA 中培养。每 10 天换 1 次培养基。1 月后根据叶片上不定芽分化及生长状况筛选叶片外植体 Km 临界耐受浓度。

1.2.1.2 生根诱导 Km 敏感性试验 将长度约 1 cm 的不定芽放入含有 0、20、40 和 60 mg · L⁻¹ Km

的生根培养基 1/2 MS + 0.05 mg · L⁻¹ NAA + 0.05 mg · L⁻¹ BA 中培养。培养 30 d 后, 根据各浓度生根状态, 筛选适宜的 不定芽生根诱导的 Km 临界耐受浓度。

1.2.2 抑菌抗生素种类和浓度的确定 将头孢霉素 (Cef)、羧苄霉素 (Carb) 的浓度设为 200、300、500、600、800、1 000 mg · L⁻¹。观察不同种类、不同浓度的抑菌抗生素对农杆菌 LBA4404 的抑制作用。

1.2.3 抑菌抗生素对叶盘分化不定芽的影响 本试验设立了无抗生素, Cef 300 mg · L⁻¹、Carb 300 mg · L⁻¹ 三种处理, 研究了不同种类的抑菌性抗生

素对叶盘分化不定芽的影响。

1.3 转化及筛选

采用优化的银腺杨 (84K) 叶片最适转化系统: 接 LBA4404 单菌落到 YEP 液体培养基 200 mL 中, 28 ℃, 150 r · min⁻¹, 过夜振荡培养, 活化菌液至稀奶状后, 用 MS 液体培养基稀释 10 倍, 将银腺杨 (84K) 无菌苗叶片, 沿主脉横切后, 浸染 5 min, 共培养 4 d。不定芽筛选培养基 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ NAA + 500 mg · L⁻¹ Carb + 50 mg · L⁻¹ Km。转化植株筛选培养基 1/2 MS + 0.05 mg · L⁻¹ NAA + 0.05 mg · L⁻¹ 6-BA + 500 mg · L⁻¹ Carb + 40 mg · L⁻¹ Km。

以上不定芽培养基中附加蔗糖 30 g · L⁻¹, 生根培养基均附加蔗糖 15 g · L⁻¹, 两种培养基中: 琼脂 6 g · L⁻¹, pH 值 5.8; 培养条件为 25 ± 1 ℃, 每天光照 12 ~ 14 h, 光照强度为 2 000 ~ 3 000 lx。

1.4 卡那霉素抗性植株的 PCR 检测

1.4.1 DNA 提取

1.4.1.1 银腺杨 (84K) 叶片 DNA 提取 采用 CTAB 法^[24]。

1.4.1.2 阳性对照质粒 DNA 提取 取少许 LBA4404 农杆菌溶于 50 μL 无菌水中, 在水浴中加热煮沸 10 min, 离心取上清液即可用于 PCR。

1.4.1.3 PCR 扩增及检测 分别用 *Bt(Cry IAb/Ac)* 基因和 *API* 基因的特异引物进行 PCR 扩增反应。

Bt(Cry IAb/Ac) 基因, 上游引物: GAAATG-CAGCTCCACAACAACGT

下游引物: GAAGTCGCTGGATTGGAGGT

API 基因, 上游引物: GGAAATTCGACCATGGC-CTCCAAC

下游引物: TAAGCTTTACTGCGGTGC

反应条件为 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。反应前 94 ℃ 预变性 5 min, 反应结束后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取反应混合液 5 μL, 放在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳。凝胶经 EB 染色后, 用自动凝胶成像记录 PCR 产物电泳结果。

1.5 Southern 杂交检测

对 PCR 检测为阳性的部分转基因植株进行 Southern 杂交检测, 取 10 μg 银腺杨 (84K) 基因组 DNA, 用 *Hind* III 完全酶切后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离。用毛细管转移法将 DNA 转移到尼龙膜

上, 然后与 ³²P - dCTP 标记的 *Bt* 基因探针杂交过夜 (65 ℃), 膜经漂洗后在 X 光胶片上进行放射自显影^[25]。

1.6 Bt 毒蛋白的 ELISA 检测

采用双抗夹心法, 选用美国 Agdia 公司提供的 *Bt(Cry IAb/Ac)* ELISA 试剂盒测定转化植株叶片中 *Bt* 毒蛋白的表达, 具体方法按其说明书操作。

1.7 植株抗虫性测试

每瓶放入 30 头 1 龄的杨扇舟蛾 [*Clstera ana-choreta* (Fabr.)] 幼虫, 于 20 ℃ 的人工气候箱饲养, 每 2 天更换叶片 1 次, 同时观察和记录幼虫的取食、生长和存活状况, 重复 3 次, 30 d 后统计幼虫的死亡率。

2 结果与分析

2.1 转化系统的建立

2.1.1 卡那霉素 (Km) 敏感性试验 银腺杨 (84K) 叶片外植体不定芽诱导 Km 敏感性试验结果表明, 随着 Km 浓度的增加, 叶片形成不定芽的数量逐渐减少, 颜色变浅, 当 Km 为 50 mg · L⁻¹ 时, 大部分叶片发黄, 不能产生不定芽。随着 Km 浓度的增加, 不定芽生根率和根的长度, 逐渐降低, 当 Km 为 40 mg · L⁻¹ 时, 不定芽的生根率为 44%, 根的长度不足对照的一半。因此, 银腺杨 (84K) 叶片不定芽诱导的卡那霉素临界耐受质量浓度以 50 mg · L⁻¹ 比较适宜。银腺杨 (84K) 不定芽生根诱导卡那霉素临界耐受质量浓度为 40 mg · L⁻¹。

2.1.2 抗生素对浸染农杆菌的抑制效果 外植体与农杆菌共生培养后, 其表面及浅层组织中共生有大量农杆菌, 为抑制或杀死农杆菌, 选用对革兰氏阴性菌有较好抑制作用的头孢霉素、羧苄霉素作为抑菌的抗生素。观察不同种类、不同浓度的抗生素对农杆菌的抑制效果。实验结果表明头孢霉素、羧苄霉素两种抗生素都可以抑制农杆菌的生长, 所需浓度相同, 当浓度达到 300 mg · L⁻¹ 以上时均可以抑制农杆菌 LBA4404 的生长。

2.1.3 抑菌抗生素对叶盘分化不定芽的影响 不同种类的抑菌性抗生素对叶盘分化不定芽的影响结果表明, 培养基中附加 Carb 或 Cef 对分化频率影响不大, 但比未添加抗生素的处理分化率 (90.6%) 稍有下降。Carb 与 Cef 相比, 培养基中附加 Cef 时分化频率 (87.9%) 较高, 培养基中附加 Carb 时分化系数 (6.0) 较高, 可以看到更多的丛生芽出现。

2.2 转化及筛选

一个高效的组培再生系统和遗传转化体系是植物基因工程成功的先决条件。采用优化的银腺杨(84K)叶片最适转化系统,不定芽筛选培养基 $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Carb} + 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Km}$ 。转化植株筛选培养基 $1/2 \text{ MS} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Carb} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Km}$ 。按此方法银腺杨(84K)叶片不定芽转化频率可达 35%。

2.3 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测

按方法 1.4 对所得 400 株卡那霉素抗性 84K 植株均作了 PCR 检测,其中银腺杨(84K)有 70 株呈阳性。部分植株 *Bt(Cry IAc)* 和 *API* 这两个基因的 PCR 检测结果见图 2 和图 3。

电泳分析表明,转双价 *Bt(Cry IAc)* 和 *API* 抗虫基因银腺杨(84K)植株,经 PCR 扩增各转基因植株均得到一条与阳性对照作模板 PCR 扩增带大小相同的 680 bp 条带和一条 660 bp 条带,而未转化的银腺杨(84K)植株基因组中未出现 PCR 扩增特异条带,初步证明外源 *Bt(Cry IAc)* 和 *API* 抗虫基因已整合到银腺杨(84K)基因组中。

2.4 Southern杂交分析

为了进一步验证外源基因在染色体内的整合以及拷贝数和插入位点,对经 PCR 检测为阳性的部分植株进行 Southern 杂交分析。杂交结果表明,外源基因是以单拷贝或低拷贝的形式插入到受体植株基因组中(图 4),并且各转基因植株的杂交带不一致,说明转基因植株来自不同的转化事件。

2.5 Bt毒蛋白的 ELISA 检测

外源基因编码的蛋白在转基因植株中正常表达是其发挥相应功能的主要依据。选用美国 Agdia 公司提供的 *Bt(Cry IAb/Ac)* ELISA 试剂盒测定 *Bt* 毒蛋白在转基因植株 R1、R2、R3 和 R4 中的表达情况,实验结果 *Bt* 毒蛋白在转基因植株 R1、R2、R3 和 R4 中的平均表达量分别为 0.011 0%、0.010 6%、0.010 0% 和 0.009 3%,而未转基因对照植株中 *Bt* 毒蛋白的表达量为 0.000 0% (表 1)。由表 1 可知,3 次测定中 4 个转化植株 *Bt* 毒蛋白的表达平均变异系数为 6.75%,说明这种测定方法较可靠,是一种理想的测定方法。

2.6 植株抗虫性测试

用大田中转基因银腺杨(84K)的幼嫩叶片喂养杨扇舟蛾幼虫,虫试结果(表 2)表明,转基因植株幼虫平均死亡率为 60.0% ~ 80.0%,而对照植株幼虫

平均死亡率仅为 10.0%。方差分析(表 3)表明它们之间存在显著性差异,用 Duncan 检验进行多重比较结果见表 2,依据杨扇舟蛾幼虫的死亡率和统计分析结果,可将参试植株分为 3 类(1)对照植株(CK),昆虫幼虫的死亡率为 10.0% 以下;(2)R5、R6、R7、R8 和 R9,昆虫幼虫的死亡率为 60.0% ~ 67.7%;(3)R1、R2、R3 和 R4,昆虫幼虫的死亡率为 70.0% ~ 80.0%。(2)和(3)类转基因植株杀虫率高说明基因表达水平较高,这与 *Bt* 毒蛋白的 ELISA 检测相一致。在实验过程中还观察到取食转基因植株的幼虫在死亡前出现麻痹,活动能力低下、停止取食等症状。即使取食转基因植株叶片的幼虫能存活下来,其生长发育也受到明显抑制。

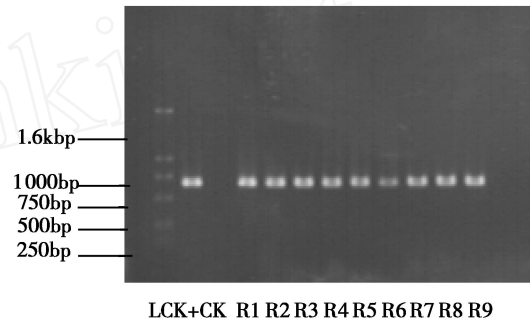


图 2 9 株 84K 杨植株 *Bt* 基因 PCR 扩增产物电泳结果
L: 2 Kb Ladder; CK₁⁺ 阳性对照 (680 bp);
CK⁻ 84K 阴性对照; R1 ~ R9: 转抗虫基因植株

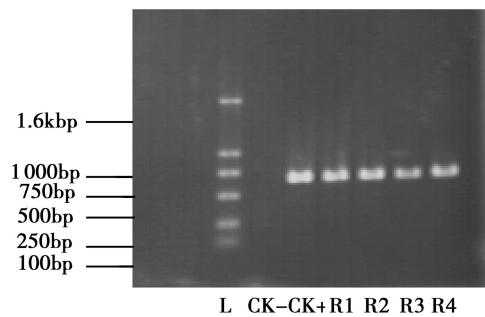
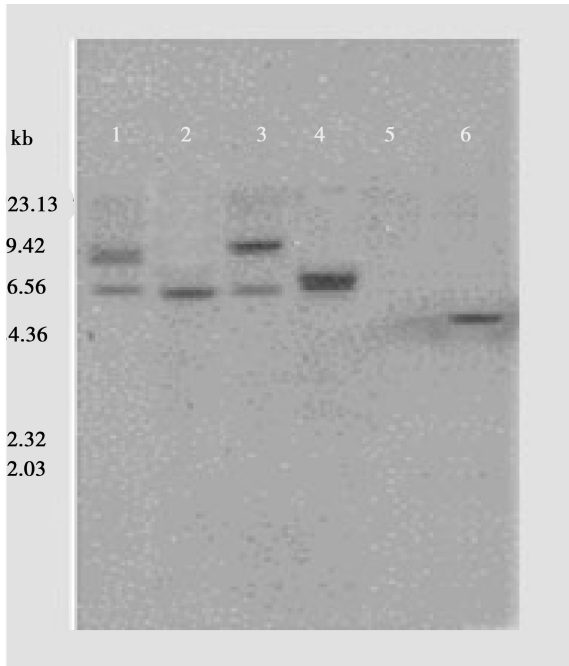


图 3 4 株 84K 杨植株 *API* 基因 PCR 扩增产物电泳结果
L: 2 Kb Ladder; CK₁⁺ 阳性对照 (660 bp);
CK⁻ 84K 阴性对照; R1 ~ R4: 转抗虫基因植株

表 1 银腺杨(84K)不同植株 *Bt* 毒蛋白表达量

株系	<i>Bt</i> 蛋白表达量 / %			<i>Bt</i> 蛋白平均表达量 / %	标准差	变异系数 / %
CK	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.00
R1	0.011 0	0.010 5	0.011 5	0.011 0	0.000 5	4.54
R2	0.010 0	0.011 0	0.010 8	0.010 6	0.000 5	4.72
R3	0.009 3	0.010 0	0.010 7	0.010 0	0.000 7	7.00
R4	0.010 0	0.009 5	0.008 4	0.009 3	0.001 0	10.75



marker; 1-4:转基因银腺杨植株,分别为 R1、
基因片段 R2、R3和 R4; 5:未转化银腺杨;
6: *Cry IAcM: /Hind I*

图 4 部分转基因植株 Southern blot杂交

表 2 转基因银腺杨 (84K)对杨扇舟蛾幼虫死亡率的影响

植株 编号	接虫 数/头	30 d成活 头数			30 d死亡 头数			平均死 亡率/%
CK	30	28	27	26	2	3	4	10.0 a
R1	30	6	7	5	24	23	25	80.0 e
R2	30	7	6	8	23	24	22	76.7 de
R3	30	9	8	7	21	22	23	73.3 cde
R4	30	8	8	8	21	22	20	70.0 bcde
R5	30	8	9	10	20	20	20	67.7 bcd
R6	30	6	8	7	24	22	23	76.7 de
R7	30	9	11	10	21	19	20	67.7 bcd
R8	30	13	11	12	17	19	18	60.0 b
R9	30	11	11	11	19	19	19	63.3 bc

注: CK未转化银腺杨 (84K); R1 ~ R9:转双价抗虫基因银腺杨 (84K),具有相同字母的表示 $P < 0.01$ 时 Duncan 检验没有显著性差异。

表 3 表 2数据的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	临界值	显著性
植株间	950.70	9	105.63	27.80	$F_{0.05} = 2.39$	显著
植株内	76.00	20	3.80		$F_{0.01} = 3.46$	
(总和)	1026.70	29				

3 结论和讨论

农杆菌介导法转化基因时,如果其标志基因为抗 Km 基因,对于不同树种、不同器官以致继代多次逐渐幼化了的组培材料等均要再次进行抗 Km 临界

浓度试验,这是基因转化能否成功的关键因素之一^[20]。银腺杨 (84K)叶片不定芽诱导卡那霉素耐受浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,不定芽生根诱导卡那霉素耐受浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究以农杆菌为介导的叶盘法,通过优化的银腺杨 (84K)叶片最适转化系统,进行双价基因 *Bt(Cry IAc)*和 *API*的转化, Southern杂交和 ELISA检测证明 *Bt(Cry IAc)*和 *API*双价抗虫基因已成功转入银腺杨 (84K)。

为了提高 *Bt(Cry IAc)*基因在植物中的表达水平,对 *Bt(Cry IAc)*基因的两端进行了改造,在 1 ~ 273 bp这个区域共改变了 12个碱基,涉及到 11个密码子的改变,一般是将第 3位的 AT改变为 GC。还改变了 2个潜在的 mRNA 转录终止信号 AATTA和 AACCAA。这一区域对提高基因表达是非常重要的。在 1342 ~ 1836区域通过 9对引物共改变了 63个碱基,涉及 60个密码子的改变,同时改变了 3个可能引起 mRNA 不稳定的 ATTA 基序和 8个 AT富集区序。外源基因在植物 DNA 中插入位置及各种原因引起其失活会导致转基因植株表现出不同的抗虫性,因此,PCR等分子生物学检测证明是转基因植株,还需要进行抗虫性生物测定试验,以观察其实际抗性。抗虫性试验表明转基因植株对杨扇舟蛾幼虫具有很好的杀虫效果,不同株系对杨扇舟蛾幼虫的致死率不同,在参试的 9个株系中,有 4个株系幼虫死亡率均在 70%以上,有 5个株系幼虫死亡率在 60% ~ 67.7%。这与郑均宝等^[20]对 741杨和田颖川^[5]、李明亮等^[21]对欧洲黑杨及王敏生等^[22]对毛白杨三倍体的研究结论相一致。转基因植株不能将害虫全部杀死,而且随着虫体的发育,杀虫效果降低,表明害虫的抗性逐渐提高。同时,转基因植株对害虫的发育也有很大的影响,存活昆虫生长发育明显地受到抑制。用美国 Agdia公司提供的 *Bt(Cry IAc)*试剂盒,对 4个株系进行了 ELISA分析,测定结果与虫试结果基本一致,表明这 2种方法结合使用,可以准确、快速地对大量转化植株进行抗虫性筛选。

杨树抗虫基因工程研究的一个重要问题,就是如何延缓害虫对转基因株系形成抗性,联合使用 2种或 2种以上杀虫机制不同或特异性结合位点不同的抗虫基因转化植物,对于防止或延迟害虫产生耐受性具有重要的作用,同时扩大了转基因植株的杀虫谱。*Bt*毒蛋白基因和其它基因(如 *PI*, *Lectin*, *Vip* 基因等)同时导入转基因植物中,其抗性和防止昆虫

产生抗性的能力将会大大的提高,可能成为抗虫基因工程的一个重要方向。在转化过程中,由于外源基因的插入是随机的,具有一定的偶然性,因此,抗虫转基因植株的培育应考虑其综合性状,既要有较高的杀虫活性(以杀虫率在 50% 以上为宜),又要考虑转基因植株的生长发育和表形特征。由于林木生长周期长,有关抗虫转基因植株的抗虫性状、表型特征及生长趋势还有待进行长期观察^[12]。西北地区是我国杨树虫害的重灾区。通过基因工程提高杨树品种的抗虫性,对于促进我国人工杨树用材林的发展和生态建设具有极为重要的意义。

参考文献:

- [1] 王永芳,高宝嘉,郑均宝,等. 杨树抗虫基因工程进展 [J]. 河北林果研究, 2001, 16(1): 83~90
- [2] 贺成林,李云. 杨树抗虫基因工程进展 [J]. 河北林果研究, 2004, 16(1): 82~89
- [3] 王忠华,舒庆尧,崔海瑞,等. *Bt* 杀虫基因与 *Bt* 转基因抗虫植物研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(1): 51~58
- [4] 伍宁丰,范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立 [J]. 科学通报, 1991, 9: 705~708
- [5] 田颖川,李太元,韩一凡,等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育 [J]. 生物工程学报, 1993, 9(4): 291~297
- [6] Wang G J, Stefano C, Chen Y. *et al* poplar (*Populus nigra* L.) plants transformation with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genome analysis [J]. Transgenic Res, 1996, 5: 289~301
- [7] McCown B H, McCabe D E, Russel D R, *et al* Transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration [J]. Plant Cell Rep, 1991, 9: 590~595
- [8] 饶红宇,黄敏仁. 杨树 NL-80106 转 *Bt* 基因植株的获得及抗虫性 [J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 1~5
- [9] Howe G T, Goldfarb B, Strauss S H. *Agrobacterium* mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants [J]. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36: 59~71
- [10] 郑均宝,张玉满,杨文芝,等. 741 杨离体叶片再生及抗虫基因转化 [J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(3): 20~25
- [11] 陈颖,韩一凡,田颖川,等. 苏云金杆菌杀虫蛋白基因转化美洲黑杨的研究 [J]. 林业科学, 1995, 21(2): 97~103
- [12] 王学聘,韩一凡,戴莲韵,等. 抗虫转基因欧美杨的培育 [J]. 林业科学, 1997, 33(1): 69~74
- [13] McNabb H S. Genetic transformation and its application to future forests [J]. Trends Biotechnol, 1987, 5(4): 155~159
- [14] Klopfenstein N B. Transformation of *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor -CAT gene fusion [J]. Can J For Res, 1991, 21: 1 321~1 328
- [15] Klopfenstein N B, McNabb J H, Hart E R. Transformation of *Populus* hybrids to study and improve pest resistance [J]. Silvae Genetica, 1993, 42: 86~90
- [16] Leple J C. Toxicity to *Chrysomela trimulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor [J]. Molecular Breeding, 1995, 1(4): 319~328
- [17] Delledonne M. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance [J]. Molecular Breeding, 2001, 7(1): 35~42
- [18] 郝贵霞,朱祯,朱之梯. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究 [J]. 植物学报, 1999, 41(12): 1 276~1 282
- [19] Barton K A. Insecticidal toxins in plant-express an insect-specific toxin from a scorpion [P]. C12N015/82, European patent patent No, EP0431829A1 1990
- [20] 郑均宝,梁海永,田颖川,等. 转双价抗虫 741 毛白杨的选择及抗虫性 [J]. 林业科学, 2000, 36(2): 13~19
- [21] 李明亮,张辉,胡建军,等. 转 *Bt* 基因和蛋白酶抑制剂基因杨树抗虫性的研究 [J]. 林业科学, 2000, 36(2): 93~97
- [22] 杨敏生,李志兰,王颖,等. 双价抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达 [J]. 林业科学, 2006, 42(9): 61~68
- [23] 田颖川,郑均宝,虞红梅,等. 转双价抗虫基因杂种 741 毛白杨的研究 [J]. 植物学报, 2000, 42(3): 263~268
- [24] 王关林,方宏筠. 植物基因工程 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744
- [25] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南 (第三版) [M]. 黄培堂,王嘉宝,朱厚础,等译. 北京: 科学出版社, 2005: 487~509